

US03/33918

01526301  
BT01 Rec'd PCT/PTT 01 MAR 2005

DERWENT-ACC-NO: 1999-170270

DERWENT-WEEK: 199918

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Separation of proteins and peptides -  
involves using mixed liquid containing organic  
solvent, water, acid and/or amine as mobile phase

PRIORITY-DATA: 1997JP-0171949 (June 27, 1997)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
JP 11023558 A	January 29, 1999	N/A
004	G01N 030/88	

INT-CL (IPC): G01N030/26, G01N030/48 , G01N030/88

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 11023558A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - A sample solution is injected into a separation column. A mixed liquid containing organic solvent, water, acid and/or amine is used as the mobile phase. The peptides and proteins are separated by normal phase liquid chromatography.

USE - For separation of proteins and peptides.

ADVANTAGE - Separation and isolation of peptides and proteins can be achieved without complicated desalination procedures. DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure represents the chromatography apparatus (EO).

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-23558

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月29日

(51) IntCl<sup>\*</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 30/88

G 0 1 N 30/88

J

30/26

30/26

A

30/48

30/48

L

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平9-171949

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

(22) 出願日

平成9年(1997) 8月27日

山口県新南陽市関成町4560番地

(72) 発明者 吉田 達成

神奈川県藤沢市湘南台4-26-5

(54) 【発明の名称】 分離方法及びこれを用いた装置

(57) 【要約】

【課題】 ペプチドやタンパク質を含む試料を分離するに際し、ペプチドやタンパク質を分離でき、さらに分離後、脱塩などの煩雑な操作をせずに精製できる方法及びその方法を用いた装置を提供する。

【解決の手段】 ペプチド及び／又はタンパク質を含有する試料を順相液体クロマトグラフィーにより分離するにあたり、該試料を分離カラムに注入した後、有機溶媒と水及び／又はアルコールとの混合液に酸及び／又はアミンを添加されてなる移動相を展開してペプチド及び／又はタンパク質を分離する方法及び装置を用いる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ペプチド及び／又はタンパク質を含有する試料を順相液体クロマトグラフィーにより分離するにあたり、該試料を分離カラムに注入した後、有機溶媒と水及び／又はアルコールとの混合液に酸及び／又はアミンを添加されてなる移動相を展開してペプチド及び／又はタンパク質を分離することを特徴とする分離法。

【請求項2】酸がトリフルオロ酢酸であることを特徴とする請求項1に記載の分離法。

【請求項3】請求項1又は請求項2に記載の移動相において、酸が移動相全量の0.01～20容積%含まれることを特徴とする分離法。

【請求項4】有機溶媒がアセトニトリルであり、かつその濃度が移動相全量の60容積%以上含まれることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の分離法。

【請求項5】分離カラムが、アミノ基、水酸基、アミド基、カルボキシル基及びスルホン酸基からなる群より選ばれる1以上の官能基を有する基材より構成されることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の分離法。

【請求項6】請求項1～5のいずれかに記載の分離法を用いることを特徴とする装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、順相クロマトグラフィーにおいて使用される分離カラムと、有機溶媒と水又はアルコールとの混合液に酸及び／又はアミンを添加した移動相を用いて、ペプチドやタンパク質を含有する試料を、分離する方法及びそれを用いた装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】液体クロマトグラフィーを用いたペプチドやタンパク質を分離する手法としては、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーがある。しかし、順相クロマトグラフィーを用いて化学修飾しないネイティブなペプチドやタンパク質を分離精製した例や報告はなかった。

【0003】この内、逆相クロマトグラフィーは、移動相に揮発性の高い有機溶媒や酸を用いるため、ペプチドやタンパク質を分離後、精製する目的においては大変有用な方法であるが、その分離機構は試料中の各ペプチドやタンパク質と分離カラムの固定相との疎水的相互作用の違いを利用して行なうため、試料中の各ペプチドやタンパク質に疎水性が無いあるいは疎水的相互作用の違いがあまり無い場合には分離することは困難であった。

【0004】一方、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを用いた方法では、逆相クロマトグラフィーを用いた方法では分離できない

ような疎水性が無いあるいは疎水的相互作用の違いがあまり無い試料中のペプチドやタンパク質を分離することは可能であるものの、いずれの方法においても移動相として塩を含む緩衝溶液を使用するため、ペプチドやタンパク質を分離後、精製するためには脱塩などの煩雑な操作が伴うという課題があった。

【0005】一方、シリカカラム、アルミナカラムといったカラムを用いる古典的かつ一般的な順相クロマトグラフィーを用いた方法は、試料中の対象物質の極性を利用して分離を行なうため、疎水性に基づく分離を行う逆相クロマトグラフィーを用いる方法とは反対の性質を持つが、移動相としてヘキサンなどの非水溶媒を用いて行なうために、試料中の対象物質の移動相への溶解性が悪く、ペプチドやタンパク質などの生体物質の分離に適用されることは無かった。

【0006】近年、シリカや樹脂などのゲル基材にアミノ基、水酸基(OH)、アミド基といった極性基を結合させた化学結合型の固定相が順相クロマトグラフィー用として開発され、これらは有機溶媒と水又はアルコールの混合液を移動相として用いることができるため、従来の順相クロマトグラフィーによる方法において溶解性が問題となり使用できなかった生体試料への適用が可能となった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記記載の背景のもとに、本発明の目的は、ペプチドやタンパク質を含む試料を分離するに際し、ペプチドやタンパク質を分離でき、さらに分離後、脱塩などの煩雑な操作をせずに精製できる方法及びその方法を用いた装置を提供することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を課題を解決すべく鋭意検討を行なった結果、シリカや樹脂などのゲル基材に水酸基(OH)やアミド基などの極性基を結合させた化学結合型の固定相を用い、揮発性の高い有機溶媒と水又はアルコールの混合液に酸やアミンを添加した移動相を用いた順相クロマトグラフィーによる方法より、逆相クロマトグラフィーによる方法では分離し難いペプチドやタンパク質を含む試料を分離することが可能であること、さらに、移動相として逆相クロマトグラフィーによる方法で使用される揮発性の高い有機溶媒、酸、アミンを選択することにより、ペプチドやタンパク質を分離後、脱塩などの煩雑な操作をせずに精製できることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を図面に基づいて詳細に説明する。

【0010】尚、本明細書においては、「ペプチド」という語は、その構成するアミノ酸をも含む意味で用いられる。

3

【0011】図1は本発明の順相クロマトグラフィーによる方法を用いたペプチド及び／又はタンパク質の分離を実施する装置を示すものである。

【0012】図1において、第1移動相瓶1と第2移動相瓶2は移動相（本明細書においては、溶離液ということもある）を貯蔵するための瓶であり、それぞれ、溶離液1、溶離液2が貯蔵されている。これらの貯蔵されている溶離液1及び溶離液2はその中の有機溶媒の濃度が両者で異なる。また、瓶の大きさ、形状、材質は特に限定されるものではなく、大きさとしては、分離や精製するために必要な移動相を越える量貯蔵できればよく、形状も次に示す送液ポンプ3により、その貯蔵されている溶液が送液できるものであればよい。材質としても移動相を貯蔵した場合に安定的にその溶液が貯蔵できればよく、例えば、ガラスや高分子樹脂などが例示できる。

【0013】送液ポンプ3は第1移動相1と第2移動相2とを勾配的に送液するためのものである。送液の条件としては、特に限定はなく、試料中のペプチド及び／又はタンパク質を分析するような小規模のシステムにより実施する場合には、分離カラムの大きさにより異なるが、通常1.5ml/分以下の流速により実施される。さらに具体的には、カラムの内径が4.6mm程度の場合には、0.7~1.0ml/分の範囲の流速が、カラムの内径が2.0mm程度の場合には、0.1~0.2ml/分の範囲の流速が好ましく用いられ、このような流速を達成できる送液ポンプであればよい。また、大規模のシステムにより試料中の特定のペプチド、タンパク質の精製を実施する場合には、カラムの大きさや試料中の特定のペプチド、タンパク質の分離パターン等に応じて適宜必要な性能を有する送液ポンプを用いればよい。

【0014】尚、第1移動相1と第2移動相2とを勾配的に送液する必要がない場合には、第1移動相1又は第2移動相2のいずれかのみを用いればよい。

【0015】4は試料注入装置であり、用いられる試料の容量は任意の量に変えることができ、又、注入に際しては、手動によりもしくは自動的に注入できる。試料の注入量としては、小規模の分析に用いる場合と大規模の精製に用いる場合とではその容量は異なり、適宜必要な試料容量を注入できる試料注入装置を用いればよい。

【0016】5は分離カラム、6は恒温槽であり、分離カラム5は恒温槽6に入った状態にて一定の温度に保たれる。又は、温度調整を必要としない場合には、分離カラム5は恒温槽にて温度を調整を行わなくとも良い。

【0017】恒温槽6は、分離カラム5の温度を一定に保つために用いられ、空気等のガスや水等の液体などを媒体として、加熱及び／又は冷却の機構によりその温度を一定に保つ機能を有するものである。ここで、恒温槽の保つことができる温度としては、分離の対象、目的にも左右されるため、一概にはいえないが、10~70℃の温度範囲が好ましく、さらに30~50℃の温度範囲

4

が好ましい。この理由としては、移動相の水点を越える温度である必要があると共に、沸点をこえる温度であってはならないという制約があるためである。さらに、この範囲を外れるような条件の場合には、分離の対象とする試料中のペプチドやタンパク質が劣化してしまう場合もあるからである。

【0018】7は検出器であるが、分離の対象とする試料中のペプチド及び／又はタンパク質が検出でき、移動相による妨害を受けない原理によるものであれば特に限定されるものではなく、例えば、紫外吸収検出器、可視吸収検出器、蛍光検出器、発光検出器等の公知手段を用いることができ、検出波長についても公知の条件にて行えばよい。さらに、この検出器を記録計に接続して得られた信号を紙等へ出力又は電気記録媒体へ記録して分析、精製に利用することができる。

【0019】また、上記記載の1~7の各部との間を接続する送液管については、耐圧性があれば、その材質、内径、外径、長さ等には特に限定されることはなく、通常、ステンレス等の金属や、高分子樹脂などが好ましく用いられる。

【0020】このように構成されたクロマトグラフ装置において、以下に示す実施例においては、第1移動相瓶1はアセトニトリル：水=97：3（体積基準）の割合で混合した溶液に0.1%のトリフルオロ酢酸を添加したものをを用いたが、有機溶媒としては、プロトンの供与、受容にあまり関与せず、水又はアルコールと混和できることが必須である。このような有機溶媒としては、シアン化炭化水素等が好ましく用いられ、さらにアセトニトリルが好ましく用いられる。その濃度としては、分離能の面から、移動相全量の60容積%以上が、さらに70容積%以上が好ましい。

【0021】また、水としては、上記記載の検出器に影響を与えないものであれば特に限定されず、冷水、温水のいずれも用いることができる。さらに、水の代わりに用いられることのあるアルコールとしては、有機溶媒と混和できるものであれば特に限定されないが、分離する際に有機溶媒と完全に混和でき、また、分離の対象とする試料中のペプチドやタンパク質が劣化しないようなものであればよい。例えば、メチルアルコール、エチルアルコール等が例示できる。さらに、水とアルコールとを併用することもできる。

【0022】有機溶媒と水又はアルコールとの混合比率としては、分離能の点から、（水又はアルコール）／（有機溶媒）が0~0.3となる範囲（体積基準）であることが好ましい。尚、ここでいう混合比率とは、ペプチド及び／又はタンパク質を含む試料を分離する際に実質的に使用される場合のことをいう。

【0023】さらに、移動相にゲル基材へのイオンの吸着対策、すなわち、ペプチド等を含む試料の回収率を向上させる手段として、移動相に酸を添加する。酸の種

類としては、トリフルオロ酢酸、蟻酸、酢酸などの有機酸や、無機酸が好ましく用いられ、さらに、精製に使用する場合に有効である脱塩操作を必要としない揮発性の点から有機酸が、特にトリフルオロ酢酸が好ましく用いられる。その含有比率としては、移動相全量に対して、体積基準で0.01~20%の範囲で用いることが好ましい。

【0024】また、アミン類も酸と一緒にもしくは酸の代わりとして用いることができる。用いられるアミンの種類としては、3級のアミンが好ましく、さらにトリエチルアミン、トリメチルアミンが好ましく用いられる。その含有比率としては、全移動相に対して、体積基準で0.01~20%の範囲で添加することが出来る。

【0025】第2移動相2に貯蔵する移動相としては、実施例においては、アセトニトリル：水=55：45の割合で混合した溶液に0.1%のトリフルオロ酢酸を添加したものをを用いた。この場合、第1移動相1と同様に、その有機溶媒、水、アルコール、酸又はアミンの種類、量比を変えることができる。

【0026】分離カラムとしては、その一例としてアミド基（カルバモイル基）をゲル基材に共有結合させた、TSKgel Amide-80（東ソー株式会社製）を用いた。このようなゲル基材としては、化学結合型で順相クロマトグラフィーを行えるものであれば特に限定されるものではないが、無機系シリカ、アルミナ、有機高分子系樹脂などが好ましく用いられ、特に分離能、耐久性などの面から無機系シリカが好ましく用いられる。

【0027】また、このようなゲル基材に結合される官能基としては、順相クロマトグラフィーを行えるものであれば特に限定されるものではないが、アミノ基、アミド基（カルバモイル基）、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基が結合したものが好ましく用いられ、さらに、アミド基（カルバモイル基）、水酸基が、特に、分離能、耐久性などの面からアミド基（カルバモイル基）を結合させたものが好ましく用いられる。また、これらの官能基が2種以上あってもよい。

【0028】さらに具体的には、上記記載のTSKgel Amide-80や、水酸基をゲル基材に共有結合させた、TSKgel OH-120（東ソー株式会社製）、一般的に順相法で良く用いられるTSKgel Silica-60（東ソー株式会社製）、分離機構にプロトン供与、受容に関与するイオン交換カラムである、TSKgel SP-2SW、TSKgel SP-2PW、TSKgel SP-5PW、TSKgel CM-2SW、TSKgel CM-2PW（以上、東ソー株式会社製）などを挙げることができる。

【0029】本発明の方法においては、移動相として高い比率の有機溶媒を用いているために試料が移動相に溶解しにくい場合があるが、その場合は、蟻酸等に溶解してから移動相2、移動相1の順で希釈すればよい。試料

中の最終的な蟻酸濃度は、注入試料全量に対して、体積基準で70%まで使用することができる。

【0030】吸着されたペプチド及び/又はタンパク質を含む試料は、試料注入後まもなく移動相液2を送液ポンプ3によって移動相中の水もしくはアルコールの濃度を勾配的に増加させることによって溶出させる。実施例においては、溶出のための勾配は一例として、表1に示すようなグラジエントカーブによって行った。

【0031】

【表1】

時間(分)	0	90	91
第1移動相	100	0	100
第2移動相	0	100	0

【0032】ここで、溶出のための勾配の条件としては、直線勾配のみならず、曲線勾配としても良く、試料中の分離対象物質により適宜変更しても良い。

【0033】このようにして分離カラムから溶出されてきたペプチド、タンパク質は、検出される。図2においては、吸収波長215nmの紫外吸収検出器により検出し、種々のペプチドを分離したクロマトグラムが得られた。ここで、検出の方法としては、溶出された分離対象物質を直接検出しても良いが、図1に示される検出器の前に、送液ポンプ及び検出用溶液を加え、分離カラムから送液された溶液と合流させるという方法を用いても良い。この際に用いられる、送液ポンプとしては上記記載のものと同一ような構成でよく、また、検出用溶液としては、分離対象物質と反応して、紫外あるいは可視の吸収を有する物質となったり、蛍光性物質となるようなもの、例えば、ニンヒドリンやオルトフタルジアルデヒドなどの化合物を含む溶液を用いることで達成される。

【0034】図2は実施例として示されるクロマトグラムである。図2において、(A)は従来の逆相クロマトグラフィーによる方法であり、カラムとしてTSKgel 10DS-80Tsが使用され、(B)は本発明の順相クロマトグラフィーによる方法であり、カラムとしてTSKgel Amide-80が使用された。クロマトグラフィーの条件としては、(A)においては、移動相1として0.1容積%のトリフルオロ酢酸及び5容積%のアセトニトリルを含む水溶液、移動相2として0.1容積%のトリフルオロ酢酸及び55容積%のアセトニトリルを含む水溶液を、83.3分間にて移動相1より移動相2へと直線濃度勾配により溶出させたものである。

(B)においては、移動相1として0.1容積%のトリフルオロ酢酸及び97容積%のアセトニトリル、移動相2として0.1%のトリフルオロ酢酸を含む55容積%のアセトニトリル（以上、残りは水）を、70分間にて移動相1より移動相2へと直線濃度勾配により溶出させたものである。試料の容量は20μl、分離温度は40℃である。図2より明らかなように、本発明の方法によれば、各ペプチドがその分離カラムとの疎水的相互作用